

⑫ 公開特許公報(A) 平1-243989

⑤ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)9月28日

C 12 N 15/00

A-8412-4B

C 07 H 21/04

C 07 K 13/00

C 12 N 1/20

8318-4H

G-8515-4B

7823-4B

//C 12 N 9/00

C 12 R 1:19

審査請求 未請求 請求項の数 12 (全15頁)

⑭ 発明の名称 グルタミン合成酵素の遺伝情報を有するDNAおよびその用途

⑰ 特 願 昭63-68671

⑱ 出 願 昭63(1988)3月23日

⑲ 発 明 者 嵯 峨 井 均 静岡県三島市中128-51

⑲ 発 明 者 太 田 晴 美 静岡県田方郡菰山町四日町922-1 シティハイムエステート201

⑲ 発 明 者 石 川 英 彦 静岡県田方郡函南町丹那202

⑳ 出 願 人 東洋醸造株式会社 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1

㉑ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

グルタミン合成酵素の遺伝情報を有する
DNA およびその用途

2. 特許請求の範囲

1. グルタミン合成酵素を構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNA。

2. グルタミン合成酵素を構成するポリペプチドのアミノ酸配列が、N末端側より第1図(1)~(2)で表わされるものである請求項第1項記載のDNA。

3. 塩基配列が、5'末端側より第2図(1)~(2)で表わされるものである請求項第1項記載のDNA。

4. 宿主にとって外来性であるグルタミン合成酵素を構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを保持することを特徴とする形質転換体。

5. グルタミン合成酵素を構成するポリペプチドのアミノ酸配列が、N末端側より第1図(1)~(2)で表わされるものである請求項第4項記載の形質転換体。

6. 塩基配列が、5'末端側より第2図(1)~(2)で表わされるものである請求項第4項記載の形質転換体。

7. 形質転換体が、エシエリヒア属に属する微生物である請求項第4項記載の形質転換体。

8. エシエリヒア属に属する微生物がエシエリヒア・コリである請求項第7項記載の形質転換体。

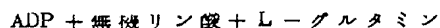
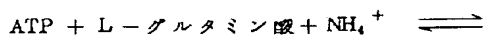
換体。

9. エシエリヒア・コリがエシエリヒア・コリ DH1 pGS 2 [微工研菌寄第 9492 号; FERM P-9492] 株である請求項第 8 項記載の形質転換体。

10. N 末端側より第 1 図(1)~(2)で表わされるアミノ酸配列を有するグルタミン合成酵素を構成するポリペプチド。

11. 宿主にとつて外来性であるグルタミン合成酵素を構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む DNA を保持した形質転換体を培養して該 DNA の遺伝情報を発現せしめ、該培養物からグルタミン合成酵素を構成するポリペプチドを採取することを特徴とするグルタミン合成酵素の製造法。

ーゼ (ADP-フォーミング) [L-Glutamate : ammonia liqase (ADP-forming)] と称し、少なくとも下記反応式



で示される反応を触媒する酵素である [酵素ハンドブック, 第 775 頁, 1982 年 12 月 1 日, 朝倉書店発行]。

このグルタミン合成酵素は各種高等動物の脳や肝、マメの種子中に存在するほか、マイクロコッカス (Micrococcus) 属、ブレヴィバクテリウム (Brevibacterium) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属 [特開昭 57-33594 号公報、同 59-155321 号公報]、メタノバクテリウム

12. グルタミン合成酵素を構成するポリペプチドのアミノ酸配列が、N 末端側より第 1 図(1)~(2)で表わされるものである請求項第 11 項記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

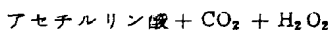
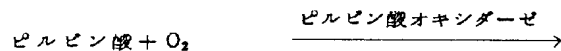
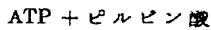
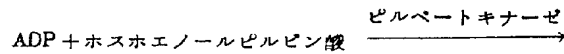
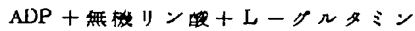
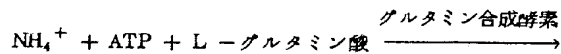
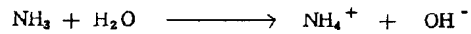
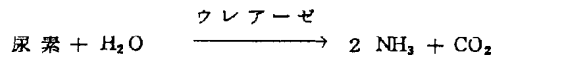
本発明はグルタミン合成酵素 (Glutamine synthetase) の遺伝情報を有する DNA、該 DNA を保持してなる形質転換体、該形質転換体により該 DNA の遺伝情報を発現せしめて得られるポリペプチドおよびその製造法に関する。

[従来の技術]

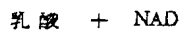
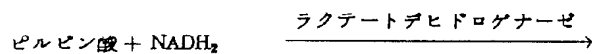
グルタミン合成酵素は、E. C. 6. 3. 1. 2, 系統名を L-グルタメイト : アンモニアリガ

(Methanobacterium) 属 [Arch. Microbiol., 1986, 144 (4), 350-354]、バチルス (Bacillus) 属 [J. Biochem., 1985, 98 (5), 1211-1219] に属する微生物により生産されることが知られている。

グルタミン合成酵素は、その触媒する反応において前記反応式の如く NH_4^+ イオンを利用することから、被検液中に予め存在するかもしれない前駆体化合物から遊離された NH_4^+ イオンを定量するか、またはそれらの NH_4^+ イオンを消去せしめるに有用な酵素試薬である [特開昭 61-56095 号公報]。例えば下記の反応の如くして NH_4^+ イオンの定量もしくは消去、または尿素の定量もしくは消去のための試薬として利用されている。



または



すなわち、最終的に H_2O_2 を生成せしめる反応系または NADH_2 を消費する反応系とすることにより定量ができる。 H_2O_2 を生成せしめる

〔課題を解決するための手段〕

そこで本発明者らはグルタミン合成酵素の生産性向上、夾雑酵素の含量低減並びに製造コストの低減を図るべく鋭意検討を試みたところ、遺伝子工学的手法を応用することによつてグルタミン合成酵素の遺伝子クローニングに成功し、かつその一次構造を解析した。さらにこの遺伝子を微生物に形質転換せしめ、該形質転換体を培養することにより優れたグルタミン合成酵素の製造法を確立した。

本発明は上記の知見に基づいてなされたものであり、グルタミン合成酵素を構成するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む DNA、該 DNA を保持する形質転換体、該 DNA の遺伝情報を発現せしめて得られ

反応系において、簡便には H_2O_2 電極もしくは H_2O_2 -ペルオキシダーゼ発色法にて定量するか、または生成 H_2O_2 にさらにカタラーゼを用させて消費せしめてもよい。また NADH_2 を消費する反応系においては、 $340 \sim 360 \text{ nm}$ の吸収波長にて吸光度の減少量を定量するのが簡便である。

〔発明が解決しようとする課題〕

しかしながら従来から報告されているグルタミン合成酵素の生産菌は生産性が低く、また共存する他種酵素の除去が困難であり、有利なグルタミン合成酵素の生産方法が望まれていた。またグルタミン合成酵素の詳細な化学構造やその遺伝子特性については報告されていない。

るポリペプチド、およびその製造法を提供するものである。

本発明の DNA は、例えば遺伝子組換え技術を利用し次の如くして製造される。すなわち、グルタミン合成酵素生産能を有するグルタミン合成酵素遺伝子の供与体である微生物より該微生物の DNA を分離精製した後、超音波、制限酵素などを用いて切断した該 DNA と切断してリニヤーにした発現ベクター^とを両 DNA の平滑または接合末端部において DNA リガーゼなどにより結合閉環させ、斯くして得られた組換え DNA ベクターを複製可能な宿主微生物に移入した後、ベクターのマーカとグルタミン合成酵素の活性とを指標としてスクリーニングして取得した該組換え DNA ベクターを

保持する微生物を培養し、該培養菌体から該組換え DNA ベクターを分離精製し、次いで該組換えベクターからグルタミン合成酵素遺伝情報を有する本発明 DNA を採取することにより製造される。

グルタミン合成酵素遺伝子の供与体である微生物としては、グルタミン合成酵素産生能を有する微生物や各種高等動物の産生組織、例えばバチルス属に属するバチルス・エスピー・EH 113、バチルス・セレウス (J. Biochem., 1985, 98 (5) 1211-1219)、マイクロコッカス属に属するマイクロコッカス・グルタミカス (Micrococcus glutamicus) ATCC 13032、同 ATCC 13060、同 ATCC 13059、プレビバクテリウム属に属するブ

を、グルタミン合成酵素遺伝子の供与体として利用してもよい。

遺伝子の供与体である微生物から由来する DNA は次の如くして採取される。即ち、供与微生物である上述した細菌のいずれかを、例えば、液体培地で約 1～3 日間通気攪拌培養し、得られる培養物を遠心分離して集菌し、次いでこれを溶菌させることによつてグルタミン合成酵素遺伝子の含有溶菌物を調製することができる。溶菌方法としては、例えばリゾチームやダーグルカナーゼなどの細胞壁溶解酵素による処理が施され、必要によりプロテアーゼなどの他の酵素やラウリル硫酸ナトリウムなどの界面活性剤が併用され、さらに細胞壁の物理的破壊法である凍結融解やフレ

レビバクテリウム・フラバム (Brevibacterium flavum) ATCC 14067、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (B. ammoniagenes) ATCC 6872、同 ATCC 6871、(特開昭 57-33594 号公報、同 59-155321 号公報)、メタノバクテリウム属に属する生産菌や各種高等動物の肝または脳における産生組織 [The Enzymes (2nd ed.) 6, 443-468 (1962)、Adv. Enzymolo. 31, 183-218 (1968)、The Enzymes (3rd ed.) 10, 699-754 (1974)] 等が挙げられ、就中グルタミン合成酵素生産微生物が好ましい。

また遺伝子組換え技術によりグルタミン合成酵素生産能を付与せしめた形質転換微生物

ンチプレス処理を上述の溶菌法との組み合わせで行つてもよい。

このようにして得られた溶菌物から DNA を分離、精製するには、常法に従つて、例えばフェノール抽出による除蛋白処理、プロテアーゼ処理、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈澱、遠心分離などの方法を適宜組み合わせることにより行われる。

分離精製された微生物 DNA を切断するには、例えば、超音波処理、制限酵素処理などにより行うことができるが、得られる DNA 断片とベクターとの結合を容易ならしめるため、制限酵素、とりわけ特定ヌクレオチド配列に作用する、例えば、EcoR I, Hind III, BamH I などの II 型制限酵素を用いる方法が適してい

る。

ベクターとしては、宿主微生物体内で自律的に増殖しうるファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが通している。

ファージとしては、例えば、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を宿主微生物とする場合には、 λ gt \cdot λ C, λ gt \cdot λ B などが使用できる。

また、プラスミドとしては、例えば、エシエリヒア・コリを宿主微生物とする場合には pBR322, pBR325, pACYC184, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19 などが、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*) を宿主微生物とする場合には pUB110, pC194

え DNA を作成する。必要ならば、アニーリングの後、宿主微生物に移入して、生体内の DNA リガーゼを利用し組換え DNA を作成することもできる。

宿主微生物としては、組換え DNA が安定かつ自律的に増殖可能で、且つ外来性 DNA の形質が発現のできるものであればよく、例えば、宿主微生物がエシエリヒア・コリの場合、エシエリヒア・コリ DH1, エシエリヒア・コリ HB101, エシエリヒア・コリ W3110, エシエリヒア・コリ C600 等が利用出来る。

宿主微生物に組換え DNA を移入する方法としては、例えば、宿主微生物がエシエリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換え DNA の移入を行い、

などが使用でき、さらに、エシエリヒア・コリおよびサツカロマイセス・セレビシアなどのグラム陰・陽両性にまたがる二種以上の宿主微生物体内で自律的に増殖可能なシャトルベクターを利用することもできる。このようなベクターを、先に述べたグルタミン合成酵素遺伝子供与体である微生物 DNA の切断に使用した制限酵素と同じ制限酵素で切断して、ベクター断片を得ることが好ましい。

微生物 DNA 断片とベクター断片とを結合させる方法は、公知の DNA リガーゼを用いる方法であればよく、例えば、微生物 DNA 断片の接着末端とベクター断片の接着末端とのアニーリングの後、適当な DNA リガーゼの作用により微生物 DNA 断片とベクター断片との組換

またバチルス属に属する微生物の場合には、コンピテントセル法またはリポソーム組換え DNA のプロトプラスト宿主細胞内への電気的な融合移入法などを採用することができ、さらにマイクロインジェクション法を用いてもよい。

宿主微生物への目的組換え DNA 移入の有無についての選択は、目的 DNA 断片を保持する組換え DNA であるベクターの薬剤耐性マーカーとグルタミン合成酵素とを同時に発現し得る微生物を検索すればよく、例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、且つグルタミン合成酵素を生成する微生物を選択すればよい。

このようにして一度選択されたグルタミン

合成酵素遺伝子を保有する組換え DNA は、形質転換微生物から取り出され、他の宿主微生物に移入することもできる。また、グルタミン合成酵素遺伝子を保持する組換え DNA から制限酵素などにより切断してグルタミン合成酵素遺伝子である DNA を切り出し、これと同様な方法により切断して得られる他の開環ベクター末端とを結合させて新規な特徴を有する組換え DNA を作製して、他の宿主微生物に移入することもできる。

また本質的にグルタミン合成酵素活性であるグルタミン合成酵素ムテインの DNA は、本発明のグルタミン合成酵素遺伝子から遺伝子工学的手法により作製される人工変異遺伝子を意味し、この人工変異遺伝子は部位特異的

を用い、宿主微生物としてエシエリヒア・コリを用いて得られたプラスミド中のグルタミン合成酵素遺伝子の塩基配列は第2図(1)~(2)の通りである。

第2図(1)~(2)において、5'末端側たる GCA の上流コドンは、アミノ酸をコードするコドンであればいずれでもよく、更に、その5'末端側にアミノ酸をコードするコドンを1個以上有してもよいが、好ましくは ATG またはシグナルペプチドに対応するポリデオキシリボ核酸を挙げることができる。また、3'末端側たる TAT の下流コドンは、翻訳終止コドンまたはアミノ酸をコードするコドンであればいずれでもよく、更に、その3'末端側にアミノ酸をコードするコドンを1個以上有してい

塩基変換法および目的遺伝子の特定 DNA 断片を人工変位 DNA 断片で置換するなどの種々なる遺伝子工学的方法を使用して得られ、斯くして取得された人工変異遺伝子のうち特に優れた性質を有するグルタミン合成酵素ムテイン DNA については、最終的には、このムテイン DNA をベクターに挿入せしめて組換え DNA を作成し、これを宿主微生物に移入させることによつて、グルタミン合成酵素ムテインの製造が可能である。

かくして得られる本発明 DNA の塩基配列は、Science 214, 1205~1210 (1981年) に示されているジデオキシ法で解説し、決定することができる。例えばグルタミン合成酵素遺伝子供与体としてバチルス属に属する菌

もよいが、その場合には、この複数個のコドンの3'末端にさらに翻訳終止コドンを有することが好ましい。

また、本発明 DNA を発現させることにより生産されるポリペプチドのアミノ酸配列は、DNA の塩基配列から予測決定できる。なお、該ペプチドのN-末端部を構成する部分アミノ酸配列は、以下の如くして決定できる。すなわち、グルタミン合成酵素産生能を有するグルタミン合成酵素遺伝子供与微生物を栄養培地で培養して菌体内にグルタミン合成酵素を産生蓄積せしめ、培養終了後、得られた培養物をろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、

また必要に応じてEDTAおよび／または適当な界面活性剤等を添加すれば、グルタミン合成酵素が可溶化され、水溶液として分離採取される。この様にして得られたグルタミン合成酵素の水溶液を濃縮するか、または濃縮することなく硫酸分画、ゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーにより処理して、高純度グルタミン合成酵素が得られ、高純度グルタミン合成酵素を用いて液相プロテインシーケンサー（ベックマン社製：BECKMAN System 890ME）によりグルタミン合成酵素であるペプチドのN末端部を構成する部分アミノ酸配列が決定される。また、少なくとも、該部分アミノ酸配列は、遺伝子操作によつて得られたグルタミ

ン合成酵素のN末端部分アミノ酸配列と一致するものであることを確認した。第2図(1)～(2)で示す塩基配列から、上記の如くして決定されたアミノ酸配列は第1図(1)～(2)の通りである。第1図(1)～(2)のアミノ酸配列において、N末端側であるAlaの上流にはさらに一個または複数個のアミノ酸残基を有していてもよく、そのアミノ酸残基としてはMetまたはシグナルペプチドが挙げられる。またC末端のTyrの下流には、さらに一個以上のアミノ酸残基を有していてもよい。

かくして得られる形質転換体は、栄養培地にて培養することにより多量のグルタミン合成酵素活性を有するペプチドを安定に産生する。

形質転換体である宿主微生物の培養形態は宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すれば良く、通常多くの場合は、液体培養で行うか、工業的には深部通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては、酸化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シクロロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、糖蜜などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛

などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

培養温度は菌が発育し、グルタミン合成酵素を生産する範囲で適宜変更し得るが、エシエリヒア・コリの場合、好ましくは20～42℃程度である。培養時間は、条件によつて多少異なるが、グルタミン合成酵素が最高収量に達する時期を見計らつて適当な時期に培養を終了すればよく、通常は12～48時間程度である。培地中は菌が発育し、グルタミン合成酵素を生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH6～8程度である。

培養物中のグルタミン合成酵素が培養液中に存在する場合には、菌体を含む培養液そのままを採取し、利用することもできるが、一

般には常法に従つて、濾過、遠心分離などにより培養液中のグルタミン合成酵素と微生物菌体とを分離した後のグルタミン合成酵素溶液が使用される。グルタミン合成酵素が菌体内に存在する場合には、得られた培養物を濾過または遠心分離などの手段により、菌体を採取し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また必要に応じてEDTA等のキレート剤および／または界面活性剤を添加してグルタミン合成酵素を可溶化し水溶液として分離採取する。

この様にして得られたグルタミン合成酵素含有溶液を、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、更に、硫酸、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、

エタノール、アセトンなどによる分別沈澱法により沈澱せしめればよい。次いでこの沈澱物を、水に溶解し、半透膜にて透析せしめて、より低分子量の不純物を除去することができる。また吸着剤あるいはゲル濾過剤などによるゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、これらの手段を用いて得られるグルタミン合成酵素含有溶液は、減圧濃縮、凍結乾燥等の処理にてより精製されたグルタミン合成酵素を得ることができる。

斯くして得られるグルタミン合成酵素の活性測定法は次の通りである。

0.2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 0.1 ml
2 M グルタミン酸ナトリウム 50 μ l

1 M 硫酸アンモニウム 50 μ l
0.2 M $MgCl_2$ 50 μ l
0.2 M ATP 10 μ l
0.1 M ホスホエノールピルビン酸 10 μ l
ピルビン酸キナーゼ (500 U/ml) 10 μ l
ピルビン酸オキシダーゼ (500 U/ml) 10 μ l
0.1 M チアミンピロリン酸 2 μ l
0.1 M KH_2PO_4 50 μ l
1 mM FAD 10 μ l
0.3 % 4-アミノアンチピリン 0.1 ml
0.2 % フェノール 0.1 ml
ペルオキシダーゼ (45 U/ml) 0.1 ml
蒸 留 水 0.348 ml

上記の組成の反応液 1.0 ml を試験管に分取し、37℃ 3分間予備加温した後酵素液 50

μ l を加えて 37℃、10分間反応を行い、反応後、2 ml の 0.5 % ドデシル硫酸ナトリウム溶液を加えて反応を停止し、反応で生じた赤色を 500 nm の波長にて比色定量する。1分間に 1 μ mole の ADP を生じる活性を 1 単位 (U) とした。

本明細書に記載のアミノ酸、ペプチド、核酸、核酸関連物質、その他に関する略号は、それらの当該分野における慣用略号に基づくもので、それらの例を以下に列記する。またすべてのアミノ酸は L 体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

RNA : リボ核酸

A : アデニン

T : チミン

G : グアニン
C : シトシン
Ala : アラニン
Arg : アルギニン
Asn : アスパラギン
Asp : アスパラギン酸
Cys : システイン
Gln : グルタミン
Glu : グルタミン酸
Gly : グリシン
His : ヒステジン
Ile : イソロイシン
Leu : ロイシン
Lys : リジン
Met : メチオニン

Phe : フェニルアラニン
Pro : プロリン
Ser : セリン
Thr : スレオニン
Trp : トリプトファン
Tyr : チロシン
Val : バリン

〔実施例〕

以下、実施例で本発明を詳細に説明するが、本発明は何らこれらによつて限定されるものではない。

実施例1 〔染色体DNAの分離〕

バチルス・エスピー EH113 (Bacillus sp. EH113) の染色体DNAを次の方法で分離した。同菌株を150 mlの普通ブイヨン培地で

37℃一晚振盪培養後遠心(3,000回転10分)により集菌した。10%サツカロース、50 mM トリス塩酸(pH 8.0) 50 mM EDTAを含んだ溶液5 mlに懸濁させ、1 mlのリゾチーム溶液(10 mg/ml)を加えて37℃、15分間保温し、次いで1 mlの10% SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)溶液を加えた。この懸濁液に等量のクロロホルム-フェノール混液(1:1)を加え、搅拌混合し、10,000 rpm 3分の遠心で水層と溶媒層に分け、水層を分取した。この水層に2倍量のエタノールを静かに重層し、ガラス棒でゆつくり搅拌しながらDNAをガラス棒にまきつかせて分離した。これを10 mlの10 mM トリス塩酸(pH 8.0)、1 mM EDTAを含んだ溶液

(以下TEと略す)で溶解した。これを等量のクロロホルム-フェノール混液で処理後、遠心により水層を分取し、2倍量のエタノールを加えて上記の方法でもう一度DNAを分離し、2 mlのTEで溶解した。

実施例2 〔グルタミン合成酵素遺伝子を有するプラスミドpGS2の作成〕

(i) 実施例1で調製したBacillus sp.の染色体DNA 2 μg(約0.5 μg)と10倍濃度のHind III切断用バッファー(100 mM トリス塩酸(pH 7.5), 70 mM MgCl₂, 0.6 M NaCl, 70 mM メルカプトエタノール) 1 μl, Hind III(宝酒造製10 unit/μl) 1 μl, 水6 μlを混合し、37℃1時間切断した。別に、pBR 322 DNA(宝酒造)約0.3 μg

を同様の方法を用いて Hind III で切断し、さらにアルカリ性フوسفターゼ（以下 BAP と略すことがある。宝酒造製）0.6 unit を加え、65℃で1時間処理した。これらの Hind III で切断した2種の DNA 溶液を混合し、その1/10量の3M酢酸ナトリウムを加え、さらに全体量と等量のクロロホルム-フェノール混液で処理し、遠心分離により水層を分取した。この水層に2倍容のエタノールを加え、遠心でDNAを沈澱させたのち減圧乾燥した。水89 μ l で溶解後、10倍濃度のライゲーションバッファ（0.5M トリス塩酸（pH 7.6）、0.1M $MgCl_2$ 、0.1M ジチオスレイトール、10mM スペルミジン、10mM ATP）10 μ l と T4 DNA リ

濁した。0℃で5分間放置後、遠心し上清をすて、さらに4mlの10mM MOPS 緩衝液（ドータイト社製）、75mM $CaCl_2$ 、10mM $RbCl$ および15%グリセリンを含んだ溶液（pH 6.5）で懸濁し、0℃で15分間放置してコンピテント細胞とした。

- (iii) このエシェリヒア・コリ懸濁液200 μ l に(i)で調製したDNA溶液10 μ lを加え、30分間0℃で放置した。BHI培地1mlを加え、37℃で90分間保温後、この100 μ lをアンピシリンとカナマイシン（各々25 μ g/ml）を含んだBHI寒天プレートにまき、37℃で一晩培養し形質転換体を得た。この形質転換体をチアミンを含むM9培地（組成は NH_4Cl 1g、 Na_2HPO_4 6g、

ガーゼ1 μ l（宝酒造製 350 unit）を加え混合し4℃で一晩放置した。このDNA溶液をクロロホルム-フェノール処理し、エタノール沈澱を集め減圧乾燥した後、10 μ lのTEで溶解した。

- (iv) 100mlのBHI培地（Brain Heart Infusion, Difco社製）で培養した対数増殖期のエシェリヒア・コリTH16株〔国立遺伝学研究所より分与を受けた、ストック番号ME8459, J. Bacteriol. 153, 1247, (1983)〕を遠心分離により集菌し（10,000rpm 2分間）40mlの氷冷した30mM酢酸カリウム、100mM $RbCl$ 、10mM $CaCl_2$ 、50mM $MnCl_2$ および15%グリセリンを含んだ溶液（pH 5.8）で懸

KH_2PO_4 3g、 $NaCl$ 0.5g、1M $MgSO_4$ 2ml、20%グルコース10ml、1M $CaCl_2$ 0.1ml、1mg/ml塩酸チアミン1ml、寒天15g、蒸留水1l）のプレートにレプリカし、37℃でさらに一晩培養した。約2000コロニーの形質転換体を調べたところ、チアミンを含むM9培地で生育した3コロニーを得、このうちの1株をエシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）DH1 pGS2株〔微生物受託番号 微工研菌寄第9492号、FERM P-9492〕と命名した。この菌を純粋分離後BHI培地で37℃一晩培養し、グルタミン合成酵素の生産性を後述するグルタミン合成酵素活性測定法により調べたところ、約3u/mlのグルタミン

合成酵素活性を有していた。

この菌株の保有していたプラスミドを実施例2と同様にしてプラスミドを分離し、グルタミン合成酵素遺伝子を含み、pACYC184遺伝子を含むプラスミドをpGS2と命名した。

実施例3 [プラスミドpGS2 DNAの分離]

プラスミドpGS2を保有するエシエリヒア・コリDH1 pGS2株を1ℓのBHI培地(Difco社製)で振盪培養した。懸濁がOD₆₀₀ = 1.0に増殖したとき、クロラムフェニコール(最終濃度200 μg/ml)を加え、さらに37℃で16時間以上振盪を続けた。3000 rpm、10分間の遠心により集菌し、リゾチーム-SDS法とセシウムクロライド-エチジウムブロマイド法(Maniortisら: Molecular

タミン合成酵素の構造遺伝子の塩基配列並びにアミノ酸配列を第1図～第2図に示した。

実施例5 [グルタミン合成酵素の製造]

遺伝子組換え株(FERM P-9492)を20ℓのBHI培地(Difco社製)で37℃20時間ジャーファーマンターにより培養し、5000 rpm 10分間の遠心で集菌した。生理食塩水2ℓで洗浄、遠心後2ℓの10 mMリン酸バッファ(pH 7.5)で懸濁した。リゾチームを1 mg/ml、トリトンX-100を0.1%となるように加えて37℃30分間保温し、5000 rpm 10分の遠心により上清液を分離した。

この上清液1.8ℓについて硫酸塩析(40%～65%)を行い、沈澱物を5000 rpm 30分の遠心により集めた。この沈澱物を

Cloning pp 86～94 Cold Spring Harbor

(1982))に従いプラスミドDNAを調製した。

実施例4 [プラスミドpGS2のマッピングおよびグルタミン合成酵素遺伝子の塩基配列の決定]

エシエリヒア・コリDH1 pGS2株から実施例3で調製したプラスミドpGS2 DNAについて制限酵素EcoRI、XbaI、SphI、BglII、NcoI、(いずれも宝酒造製)、NdeI(BRL製)による切断地図を作成した。その結果を第3図に示した。グルタミン合成酵素遺伝子を含んだDNAの塩基配列をM13ファージを用いたジデオキシ法(Science 214 1205-1210(1981))を用いて決定した。グル

250 mlの10 mMリン酸バッファ(pH 7.5)で溶解し、セファデックスG-25で脱塩処理をした。この後、DEAE-セファロースCL-6Bを用いてイオン交換クロマトを行い活性画分を分取後脱塩し、凍結乾燥により粉末標品を得た。この酵素標品を前述のグルタミン合成酵素活性測定法により測定した結果19.2 u/mgの比活性を有していた。

[発明の効果]

本発明のDNAおよび形質転換体を用いることによつて、効率よく、高純度でグルタミン合成酵素を製造することが可能となつた。また本発明によつてグルタミン合成酵素遺伝子が明らかとなつた。

4. 図面の簡単な説明

第1図(1)～(2)は本発明のDNAによつて発現されるグルタミン合成酵素のアミノ酸配列を示す図面であり、第2図(1)～(2)は、本発明のDNAの塩基配列を示す図面であり、第3図はプラスミドpGS2の制限酵素地図を示す。

以 上

出願人 東洋醸造株式会社

代理人 弁理士 有 賀 三 幸

弁理士 高 野 登志雄

弁理士 小 野 信 夫

第1図(1)

AlaLysPheThrArgGluAspIleThrArgLeuAlaLysGluGluAsnValLysTyrIle
ArgLeuGlnPheThrAspIleLeuGlyThrIleLysAsnValGluIleProValSerGln
LeuGluLysAlaLeuAspAsnLysMetPheAspGlySerSerIleGluGlyPheVal
ArgIleGluGluSerAspMetTyrLeuTyrProAspLeuAsnThrTrpValIlePhePro
TrpThrSerGluLysGlyLysValAlaArgLeuIleCysAspIleTyrAsnThrAspGly
AlaProPheAspGlyAspProArgThrAsnLeuLysArgValLeuAlaGluAlaArgGlu
MetGlyPheThrAspPheAsnLeuGlyProGluProGluPhePheLeuPheLysLeuAsp
AlaAlaGlyGluProThrLeuGluLeuAsnAspLysGlyGlyTyrPheAspLeuAlaPro
ThrAspLeuGlyGluAsnCysArgArgAspIleValLeuGluLeuGluMetGlyPhe
GluIleGluAlaSerHisHisAlaSerSerSerArgThrHisGluIleAspPheLysTyr
AlaAspAlaIleSerAlaCysAspAsnIleGlnThrPheLysLeuValValLysThrIle
AlaArgLysHisGlyLeuHisAlaThrPheMetProLysProLeuPheGlyValAsnGly
SerGlyMetHisCysProValSerLeuPheLysGlySerGlnAsnAlaPheTyrAspThr
GluGlyLysLeuGluSerLysThrAlaGluGlnPheIleAlaGlyIleIleLysHis
AlaProSerPheThrAlaValThrAsnProThrValAsnSerTyrLysArgLeuValPro

第 1 図 (2)

GlyTyrGluAlaProCysTyrValAlaTrpSerAlaLysAsnArgSerProLeuIleArg
 IleProAlaSerArgGlyValSerThrArgValGluValArgSerValAspProAlaAla
 AsnProTyrLeuAlaLeuAlaValIleLeuLysAlaGlyLeuAspGlyIleLysAsnAsn
 LeuThrProProAlaProValAspArgAsnIleTyrValMetAsnLysGluGluArgGlu
 GluValGlyIleValAspLeuProAlaThrLeuTyrAlaAlaLeuGluThrLeuLysSer
 AsnGluIleIleLysGluAlaLeuGlyAspHisLeuLeuGluHisPheIleGluAlaLys
 GluIleGluTrpAspMetPheArgThrGlnValHisProTrpGluArgGluGlnTyrMet
 SerThrTyr

第 2 図 (1)

10 20 30 40 50 60
 GCAAAGTTCACAGCTGAGACATCACTCGTTTAGCAAAAGACAAATGTTAAGTACATC
 70 80 90 100 110 120
 CGTTTACAGTTTACTCACAATTTAGGACGATTAAAGCGTTTCAATCCCACTAGTCAA
 130 140 150 160 170 180
 TTAGAAAAGCTCTTCATACAAAATGATGTTGACGGATCTTCTATTAAGCGTTCTGTA
 190 200 210 220 230 240
 CGTATCGAAGATCTGATATCTAGCTATATCTGATTTAAATACATCGGTTATCTTCCT
 250 260 270 280 290 300
 TGGACTTCTCAAAAAGGTAAAGTTGCTGCTCTAATTTGTCATATTTTATATACAGATCGA
 310 320 330 340 350 360
 GCACCTTTTCATGGAGACCCCTCGTACTAACTTAAACGCTCTCTCCAGAACGACAGAA
 370 380 390 400 410 420
 ATGGCTTCACTGATTTTAACTCTGGACCTGAACCGAATTTCTTTATTAACAAGTACAT
 430 440 450 460 470 480
 GCAGCTGGAGAGCCCACTAGAAATGAATGATTAAGCGGATACCTTTGACCTTCCGCT
 490 500 510 520 530 540
 ACTGACCTAGGAGAAAAGTCCGCTCCGCAATCTCTTCACTTGAAGAAATCGGATTT
 550 560 570 580 590 600
 GAAATTGAACCATCCCACTGCAAGTAGCTCCAGCACACACGAAATTCACCTTTAAATAT
 610 620 630 640 650 660
 GCAGATGCATTTTCAGCATGTGATACATCCAAACTTTCAAAATTTGGTTCGTTAAACGATT
 670 680 690 700 710 720
 GCCGTAAACATGCTTTACACCGCAACATTCATGCCCTAAACCATTTGTCGGTCTTAATCGA
 730 740 750 760 770 780
 TCAGGTATGCACCTCCAGTTCTTTTATCAAAAGGAAGCCAAAATGCCCTTTTACCATACA
 790 800 810 820 830 840
 GAAGAAATTAGAAGTAAGTAAACACCCAGACCAATTTATCGCTGGTATCATTAAGCAT
 850 860 870 880 890 900
 GCTCTAGCTTCACAGCGGTAAACAACCCCACTTTAATCAATACAAACGCTCTAGTCCCT

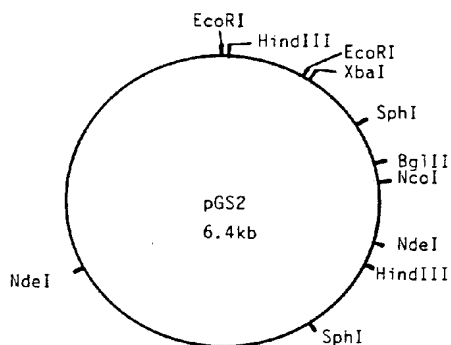
第 2 図 (2)

910 920 930 940 950 960
 CGTTACGAAGCTCCTTGTTATGTTGCTTGGTCTGCTAAAAACCGTAGCCCATTAATTCGT
 970 980 990 1000 1010 1020
 ATCCCAGCTTCACGCGGTGTTAGTACTCGTGTGAGGTACGTAGTGTGATCCAGCAGCC
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 AATCCATACTTGGCACTTGGTGTAAATATTGAAAGCTGGTCTTGACGGTATCAAAAACAAAC
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 CTAACCTCCTCCAGCTCCAGTTGACCGTAACATTTATGTAATGAATAAAGAAGACGTGAA
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GAAGTAGGAATCGTAGATCTACCAGCTACTTTATATGCTGCATTGGAACATTAAATCC
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 AATGAAATCATCAAAGAAGCTCTTGGTGATCACTTGGTTGAACACTTCATCGAAGCAAAA
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 GAAATTGAGTGGGATATGTTCCGCACACAAGTTCACCCATGGGAACGCGAACAATATATG
 1330
 TCTACTTAT

手 続 補 正 書 (自 発)

平成元年 1 月 19 日

第 3 図



特許庁長官 吉 田 文 毅 殿

1. 事件の表示

昭和63年特許願第68671号

2. 発明の名称

グルタミン合成酵素の遺伝情報を有するDNA およびその用途

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名 称 東洋醸造株式会社

4. 代 理 人

住 所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 (〒103)

共同ビル 電話(669) 0904 (代)

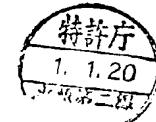
氏 名 (6870) 弁理士 有 賀 三 幸

住 所 同 上

氏 名 (7756) 弁理士 高 野 登志雄

5. 補正命令の日付

自 発



方 式 査 査



6. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

7. 補正の内容

(1) 明細書中、第5頁第2行

「liqase」とあるを

「ligase」と訂正する。

(2) 同第16頁第3行

「のグラム陰・陽両性にまたがる」とあるを
削除する。

(3) 同第21頁第9行

「ATG または」とあるを

「ATG あるいはその他の開始コドンまたは」
と訂正する。

(4) 同第38頁第8行

「このうちの1株をエシェリ」とあるを

「このうちの1株をエシェリヒア・コリ

(*Escherichia coli*) TH16 pGS2 株と命名し
た。この株からプラスミドDNAをManiatisら
の方法 (Molecular Cloning, Cold Spring
Harbor Laboratory, 1928, pp 86~94)

「Maniatis」と訂正する。

00 同第41頁第4行

「組換株」とあるを

「組換え株」と訂正する。

に従って調製した。このDNAを用いて前述と
同様の方法によりコンピテント化したエシェ
リヒア・コリDH1を形質転換し、得られた形
質転換体をエシェリ」と訂正する。

(5) 同第38頁下から第3~2行

「後述する」とあるを

「前述した」と訂正する。

(6) 同第39頁第2~3行

「実施例2と同様にしてプラスミドを分離
し、」とあるを

「前述のManiatisらの方法を用いて分離
し、」と訂正する。

(7) 同第39頁第4行

「pACYC 184」とあるを

「pBR 322」と訂正する。

(8) 同第39頁第9行

「懸濁」とあるを

「濁度」と訂正する。

(9) 同第39頁最下行

「Maniortis」とあるを